

図4 ベースピーククロマトグラムで表示した誕生直後マウスの角層脂質プロファイル (A) と主要なマウス角層 Cer サブクラスの化学構造と命名法 (B)

A. 自動化脂質分析装置を用いて交互に正負イオンモードを切り替え、MS/MS スペクトルも採取しながら測定した正負イオンのベースピーククロマトグラム ( $m/z$  400 ~ 1600)。CE, cholesterol ester; TG, triacylglycerol, Cer, ceramide; GlcCer, glucosylceramide; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; SM, sphingomyelin; LPC, lysophosphatidylcholine. B. Motta の Cer 命名法を用い、それを若干拡張した。カッコ内はマウス角層に最も豊富に検出できる分子種の  $m/z$  値。Motta の命名法では Cer の後ろの括弧内の最初に脂肪酸誘導体の記号を書き、後に長鎖塩基の種類を示す記号を書く。脂肪酸誘導体 A,  $\alpha$ -hydroxy fatty acid; O,  $\omega$ -hydroxy fatty acid; N, non- $\alpha$ -hydroxy fatty acid; E, esterified to hydroxyl; 長鎖塩基 S, sphingosine; P, phytoshingosine (4-hydroxy-sphinganine), H, 6-hydroxy-sphingosine。A に示すように角層にはこのほかに長鎖塩基の OH 基に一つ脂肪酸がエステル結合した Cer が検出できるので Motta の分類を拡張してこれを Cer (NES) とした。また遊離  $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸のリノール酸エステルも検出でき Cer 同様に脂肪酸を示す FA に EO をつけて FA (EO) とした。

行うことが可能で一回のクロマトグラフィーで多くの情報を採取することができる。スクリーニング分析では、前半の中性脂質が溶出する時間帯には正イオン MS/MS と MS<sup>3</sup> スキャンを行い、後半のリン脂質溶出時間帯には負イオンモードで同様のプロダクトイオンスキャンをすれば分子種情報を得やすい<sup>2)</sup>。なお、国際的な流れとしては、リポドミクス解析に HPLC を利用するとしても種々の MS/MS モードを用いた MS の分離機能のほうを重視する方法が普及してきており、本書第 1 編第 9 章や拙著<sup>1, 2)</sup>でも種々の MS/MS モードを駆使したリポドミクス解析法が解説されているので参照されたい。

#### 4 自動化分析装置の病態リポドミクスへの応用

MS/MS モードによる分離機能を用いる方法は有用であるが、測定対象の構造が既知でなければならぬこと、高感度化のため比較的狭い  $m/z$  範囲のみのスキャンを用いなければならないことなど測定上の制約がある。本装置では、常に広い  $m/z$  範囲 ( $\sim 180$ - $2000$ ) をスキャンし、各保持時間における最強シグナル強度をプロットしたベースピーククロマトグラム上に脂質プロファイルを描き (図 4A)、未知物質でも検出することができるので健常と疾患の差異を比較する病態リポドミクスに有用である。本装置の有用性を示す例としてスフィンゴ脂質の基本構造であるセラミド (Cer) 合成の最初のステップを触媒する酵素セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) の皮膚特異的ノックアウト (KO) マウスの角層脂質解析例を示す (Osuka S., Tojo H., Asano C., and Hirabayashi Y. 投稿準備中)。

角層の Cer は、皮膚バリアー機能の構造的基礎である角層細胞間脂質多重層ラメラの主要構成成分として重要である。Cer はデノボ合成経路あるいは種々のスフィンゴ脂質が分解され生じたスフィンゴシンを再利用する再利用経路により合成される。前者は SPT によるセリンとパルミトイル CoA の縮合反応から始まる。これまでの研究により種々のバリアー機能障害により Cer のデノボ合成が亢進すること、SPT 阻害剤塗布によりバリアー障害が起こることから、バリアー機能維持に Cer のデノボ合成が重要であることが示唆されてきた。皮膚特異的な SPT 遺伝子破壊 (KO) により表皮におけるセラミドのデノボ合成を欠損させたマウス ( $f/f$ ) は、誕生直後は野生型やヘテロ接合型 ( $f/+$ ) と大差を認めないが、1 週齢以降バリアー機能異常を呈し、Cer のデノボ合成の重要性をさらに確認できた。そこで、Cer デノボ合成が角層脂質組成をどのように維持しているかを調べるため、脂質プロファイルを 3 週齢コントロール ( $f/+$ ) と KO マウスとで比較した。

フルオレスカミン法で定量した角層膜中の総長鎖塩基量にコントロールと KO マウスで有意差はなかった。長鎖塩基の再利用経路により量的には代償が効いていることがわかる。次に本装置で分析した Cer の分子種について検討した。マウスの主要な角層セラミドサブクラスの化学構造と Motta 等の化学構造に基づくセラミド命名法<sup>8)</sup>、野生型で最も多い分子種の  $m/z$  値を図 4B に示した。NS, AS, NP では C26:0 を含む分子種、EOS, OS では C34:1 を含む分子種が通常最も多い。Cer の分子種の構造決定は、正イオンモードのデータ依存的 MS/MS あるいは MS<sup>3</sup> スキャンを用いて行う。長鎖塩基情報はアミド結合の解裂で生じるプロトン型長鎖塩基イオンとその脱水で生じるイオンを検出し、脂肪酸情報は長鎖塩基側の N-C 結合の解裂で生じるプロトン型脂肪酸アミドイオンを検出して得る。KO の Cer では、コントロールと比べると含有脂肪酸鎖長分布が短鎖側に 1 から 2 炭素分シフトする。特に  $\alpha$ -OH 脂肪酸を含む Cer (AS) では脂肪

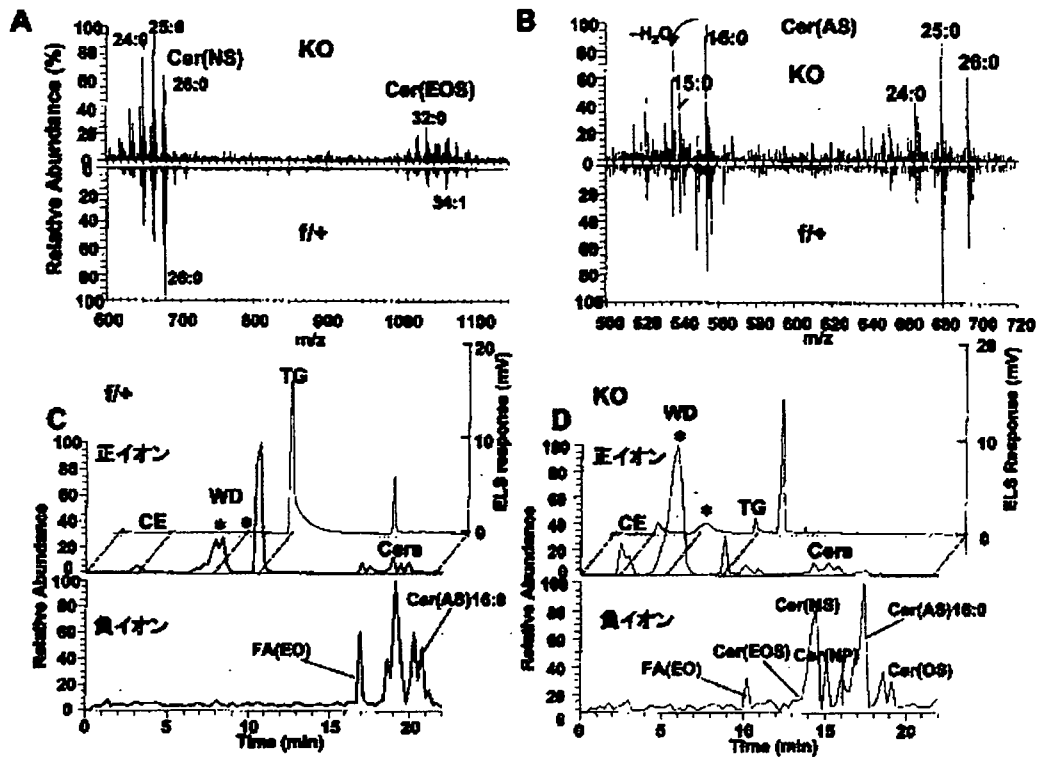


図5 表皮特異的 SPTKO マウス角層の脂質組成異常

A. Cer (NS) と Cer (EOS) のピークは若干重なっているため二つのピークの全範囲を積算して同一スペクトル上に表示した。B.  $-H_2O$  は水の脱離を示す。ピークに添えた記号は含有脂肪酸の炭素数：二重結合数を示す。C と D. WD, wax diester.

脂肪酸鎖長分布が C26:0, C25:0 と C16:0, C15:0 を中心とする二峰性を示しコントロールでは前者が多いが、KO では逆に後者が増加していた (図5)。角層ラメラ構築に最も重要と考えられている Cer (EOS) も KO の角層に存在しており、含有脂肪酸鎖長分布が短鎖側にシフトする傾向は同じであった。このことから、再利用経路においてもコントロールより短い鎖長の脂肪酸に富むけれどラメラ構築に必要な Cer 分子種が合成されることがわかった。しかし3週齢 KO ではバリア機能異常が認められることから、正規のデノボ合成経路で合成されない少し短い脂肪酸を含む Cer で形成されたラメラはバリア機能を正常に発揮できないことが示された。

脂質組成のコントロールと KO 間での顕著な差は、早く溶出される中性脂質領域に見られる。KO では、ベースピーククロマトグラム上でコレステロールエステル (CE) とトリアシルグリセロール (TG) ピークの間に大きなピークが出現し、ELS でも検出できた (図5C, D)。このピークに含まれる化合物の  $m/z$  値は、TG に類似しているが 14 おきにピークがならび TG で一般に見られる偶数個炭素数の脂肪酸に加え奇数個炭素数脂肪酸も含まれることがわかった。MS/MS スペクトルでは、TG よりも複雑な組成の脂肪酸のニュートラルロスが見られた。たとえば、同じ  $m/z$  値 874 イオンの MS/MS スペクトルの比較を図6に示す。TG の分子種では C16:0,

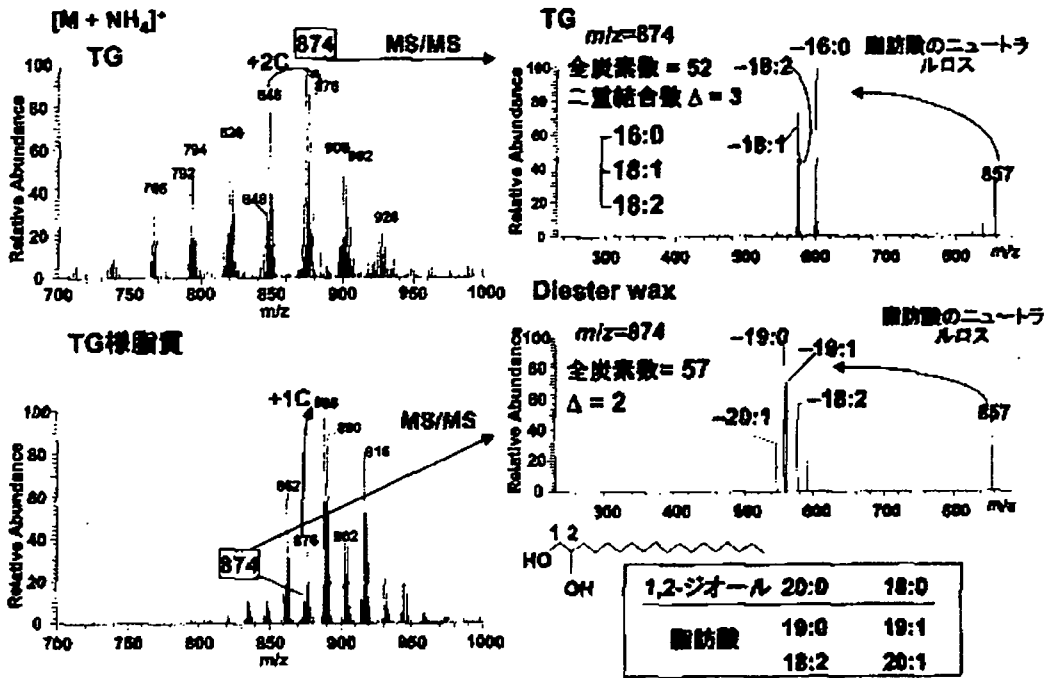


図 6 TG 様脂質の構造解析

左はマスマスペクトル右はそれぞれの MS/MS スペクトル。中性脂質はアンモニウム付加正イオンとしてイオン化される。MS/MS ではこのイオンから中性の脂肪酸アンモニウム塩が脱離（ニュートラルロス）するので脂肪酸組成を決定できる。マウス皮脂腺 WD は長鎖 1,2-ジオールを骨格にすることが報告されているのでその情報を用いた<sup>9)</sup>。

C18:1, C18:2 の脂肪酸脱離が見られるのでこれらの脂肪酸とグリセロールから TG の  $m/z$  値を計算すると 874 になり測定値と一致するので分子種が確定する。KO で増加する TG 様物質では、脱離した脂肪酸のうちどの三つを組み合わせても TG としての  $m/z$  値 874 にならず、二つの脂肪酸とのエステル結合を持つ構造を考えなければならない。溶出位置などから 1-アルキル-2,3-ジアシルグリセロールとジエステルワックス (WD) などが候補となるが、前者では標準品の溶出位置と MS/MS スペクトルが TG 様物質と異なるため除外できる。後者に関しては、マウスでは 1,2-ジオールを骨格とする皮脂腺由来の WD が報告されており<sup>9)</sup>、溶出位置も WD と矛盾しない。脱離脂肪酸と 1,2-ジオールの図に示した組み合わせで WD としての  $m/z$  値 874 を説明できる。この中性脂質は皮脂腺自体を含まない落屑にも多量検出された。KO 皮脂腺にはオイルレッド O で染色する中性脂質が多量蓄積されていたが皮下組織 TG はほとんど見られなかった。これらのことから、皮脂腺で合成される WD の分泌が亢進していることが示唆され、MS の結果が支持された。一方コントロールでは、皮脂腺よりも皮下組織の TG が濃染された。マウス皮脂腺はヒトと異なり TG を合成しないことが報告されているので、TG がコントロール角層脂質中に多いことは、サンプリング時に混入する皮下組織由来の TG 量の差を反映しているものと考えられる。以上の結果から、正常の皮膚バリアー機能維持にデノボ経路で生合成された正常脂肪酸鎖長を含

む Cer が角層ラメラに存在することが重要であることが示唆された。またバリアー機能異常を代償するために、表皮表面の疎水性度を上げ得る WD の合成・分泌が亢進することがわかった。

本稿では定量の問題に立ち入らなかった。一般に、非常に多種類の脂質クラスや分子種が存在するので個々の分子種の絶対量を MS で正確に定量するのは困難である。病態リポドミクスの目的は多くの場合、正常と異常の比較であるので、脂質抽出前に内部標準として脂質各クラスあたり天然にほとんど存在しない鎖長の脂肪酸を含む分子種を一つ添加して半定量を行って両者の差を検出している。測定対象の分子種と内部標準では鎖長が異なり含有炭素数に差があるので、イオンピークの  $^{13}\text{C}$  同位体分布が両者で異なり、適当な補正をしなければならない<sup>2)</sup>。本システムでは、MS/MS により生じるフラグメントではなく、HPLC で分離した脂質そのもののイオン強度をもとに定量を行う。この場合、リン脂質やセラミドでは鎖長の違いによりイオン化効率の差があまり無いので、各クラスに一つの内部標準添加だけでもそれほど大きな誤差にはならないと考えている。また、定量値を何でノーマライズするかにも問題が多い。

上記の例で示したように本自動化脂質分析装置は病態リポドミクス研究に有用であるので、現在種々の臨床サンプルや遺伝子操作マウス組織を用いた脂質異常解析に応用している。また、測定対象脂質を拡大する研究も進めている。リポドミクスとプロテオミクスを平行して行う研究方法により、病態や健康増進解析に役立つバイオマーカーを効率よく検索できるシステムを確立したい。

## 文 献

- 1) 東城博雅, オレオサイエンス, **4**, 3 (2004)
- 2) 東城博雅, リポドミクス 質量分析学, 大阪大学出版会, 印刷中 (2007)
- 3) S. Takagi *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **112**, 1372 (2003)
- 4) W. W. Christie, *J Lipid Res.*, **26** (4), 507 (1985)
- 5) Y. Nagatsuka *et al.*, *Methods Enzymol.*, **417**, 155 (2006)
- 6) H. Ikushiro *et al.*, *J. Bacteriol.*, **189** (15), 5749 (2007)
- 7) H. Tojo, *J. Chromatogr. A*, **1056**, 223 (2004)
- 8) S. Motta *et al.*, *Biochim Biophys Acta.*, **1182** (2), 147 (1993)
- 9) N. Nicolaidis *et al.*, *Lipids*, **5** (3), 299 (1969)

## 9. 2 リピドミクス (東城)

### 9. 2. 1. 脂質代謝とリピドミクス

生体機能は、遺伝子にコードされる情報に基づいて発現する蛋白質(酵素)と酵素により生合成・代謝される各種の低分子代謝中間体の働きにより円滑に営まれる。したがって、生体分子間相互作用の複雑なネットワークを解きほぐし生体機能の分子機構を解明するためには、蛋白質と代謝中間体の総覧的分析を相補的に行うことが重要である。主に代謝中間体の構造情報と濃度変動を高感度に検出できる質量分析(MS)法の進歩により、種々の生体反応における代謝中間体の動態を一斉分析することが可能になってきた。これを生体機能解析、医学・創薬・健康保健分野におけるバイオマーカーの探索、食品・栄養・油脂・化粧品・海洋生物・環境などの研究・開発に応用する学問をメタボロミクスと総称する。代謝中間体のうち以下のような特長を持つ水に不溶性脂質を対象とする場合、特別にリピドミクスと呼ぶ。

脂質はそれ自身低分子化合物であるが、水溶液中では自己会合して細胞形成に必須の生体膜二重層構造を形成し、受容体などの情報伝達機構のプラットフォームを提供する。骨格としての機能だけでなく刺激に応答して細胞膜脂質から多種類の脂質性シグナル分子が産生される。また生体のエネルギー源、生理活性物質として正常な生体の働きを支える重要な化合物である。リピドミクスで扱う脂質は多様であるが、化学構造に基づき図1Aのように簡便に整理しておくことで代謝経路との関係が明瞭になり理解しやすい。すなわち、アセチルCoAから生合成され炭素、水素、酸素のみからなる単純脂質とリン、窒素、硫黄なども含むグリセロールあるいはスフィンゴシンを骨格とする複合脂質に大別できる。単純脂質は複合脂質の構成成分でもある。

三大栄養素のうち糖とアミノ酸代謝は関連が深く、原則として解糖系とクエン酸回路の3から5個の炭素からなる代謝中間体を介して複雑に連携する。一方、脂質代謝は比較的閉じた代謝系を形成する。脂質のデノボ合成系の概略(図2)に示すように糖・アミノ酸代謝と脂質代謝間の架け橋は3本である。この橋を通してアセチルCoAからアシルCoAとステロイドが合成され、解糖系中間体ジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール骨格が3-ホ

スホグリセリン酸から合成されるセリンとアシル CoA からスフィンゴシン骨格が合成される。これらをもとに図 1 A にまとめた全ての脂質がグルコースから生合成される (図2)。なお脂質に付加する糖はグルコース-6リン酸から供給される。次に脂質分解系を考えてみる。複合脂質から加水分解酵素作用で遊離した脂肪酸は  $\beta$  酸化され生成したアセチル CoA は直接あるいはケトン体として輸送された後に完全酸化され二酸化炭素になるので糖代謝系に戻れない。上述した脂質骨格もリサイクル利用可能である。以上のように、脂質代謝系内の代謝中間体が他の代謝系と頻りに交換することがないという意味の閉鎖性により、リピドミクスから得られた脂質組成異常情報から関連蛋白質を推測しやすくプロテオミクス解析の効率化を助けることができる。

脂質分解系のもう一つの重要な機能は、多彩な脂質性シグナル分子や生理活性脂質を産生することである。小胞体シトゾール側でデノボ合成されたリン脂質中の特に *sn*-2位脂肪酸は、多くの場合リモデリング酵素系によりすげ替えられ鎖長・不飽和度が変更され、目的の細胞内小器官膜に輸送される。これらの膜脂質から刺激に応答したホスホリパーゼ等の酵素作用で脂質性シグナル分子が合成される。これらにはリン酸化、酸化、過酸化などによりもはや脂質と呼べない極性の化合物も含まれるが、リピドミクスの重要な標的である。

リピドミクスのデータ解析や多施設間データ比較のため脂質のデータベース化が必要である。最近、このような目的のために国際会議により吟味された包括的な分類が提案された (図 1B)<sup>1)</sup>。脂質は12桁のLIPID IDにより識別される。初めの2桁はデータベース名、次の2桁には8種類のカテゴリーコード、さらに細目として脂質クラス2桁・サブクラス2桁・サブクラスに属する個々の脂質の4桁識別番号からなる。これは米国LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) により公開・維持されており、2006年9月現在で8906件の登録がある。日本オリジナルのLipid Bank (<http://lipidbank.jp/>; LIPID ID のデータベース名、LB) も公開され利用されている。

## 9. 2. 2. リピドミクスにおける質量分析の利用法と問題点

### 脂質のイオン化法

脂質分析には、エレクトロスプレー (ESI)、大気圧化学イオン化 (APCI)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法などいわゆる“ソフト”イオン化法を用いることができるが、リポドミクスにはもっぱら高感度検出できる ESI が使われる。ESI は、ある程度電気伝導性のある溶液に溶解している不揮発性のイオン性あるいは極性化合物を他のイオン化法とくらべて低いエネルギーで直接気相の分子量関連イオンにすることができる方法である。そのイオン化効率は、エミッター先端に形成される Taylor cone 表面の脂質の密度に依存する。ほとんどの脂質は多かれ少なかれ両親媒性で表面活性な性質を持つので Taylor cone 表面の脂質密度が大きくなり ESI で効率よくイオン化することができる。ESI は、HPLC やキャピラリー電気泳動とのオンライン接続に適しており、かつ APCI とことなり低流速でのイオン化に対応しているので細径カラムを用いることや、ナノスプレーチップ、チップ先端を超撥水性処理した FortisTip を用いることで高感度化できる。

イソプレノイド (例、スクワレンやコレステロール) などの一部の非極性脂質は、ESI よりイオン化効率が低いのでイオン性官能基の誘導体化等で ESI のイオン化効率を上げる工夫が必要である。また、APCI も用いられるが感度が不十分なことも多い。最近、このような脂質のイオン化に電子獲得 APCI がきわめて有効なことが明らかにされた。APCI イオン源においてコロナ放電により生じた高エネルギー電子が噴霧用窒素ガスと反応して  $N_2^+$  ラジカルと低エネルギー電子が生成される。電子親和性官能基を持つ化合物はこの低エネルギー電子を受け取り高効率に負イオン化される。これを利用すると、ESI や APCI でイオン化効率の悪い非極性脂質を電子親和性官能基で誘導体化することにより負イオンモードで 1-2 桁程度高い感度で検出が可能となる。

MALDI 法はマトリックス由来ピークの妨害を受けやすく、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とのオンライン接続も難しい。しかし糖脂質のように高分子量の脂質は、マトリックスによる妨害がないので薄層クロマトグラフィー (TLC) との組み合わせで MALDI-TOF がよく用いられている。脂質分析には通常 2,5-ジヒドロキシ安息香酸がマトリックスとして用いられるが、正イオンモードでは  $(M+H)^+$  以外に  $Na^+$  や  $K^+$  付加イオンなどの複数の分子量関連イオ



ンが混在した複雑なスペクトルとなり感度も低下するし、負イオンモードも低感度で実用的でない。最近、ニトロアニリンと酪酸のイオン性結晶をマトリックスとするとスペクトルが単純化され感度が上昇することが報告された。また、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) やリゾホスファチジン酸 (LPA) を亜鉛含有リン酸捕獲試薬Phos-tagで錯体として高分子量側にシフトさせ単一ピークとして検出する方法が試みられている。また、大気圧下でイオン化するAP-MALDI法が開発され TOF 以外の質量分析計に接続しやすくなり、MALDI ソースでもタンデムMSが行いやすくなってきた。

#### 脂質クラス分離と分子種分析

リピドミックスの目的からすれば、全脂質の包括的分析を一度にできれば理想的である。しかし、脂質は水にまったく溶けない非極性ものから、ミセルとして完全に溶解するものまで高範囲な極性のスペクトルを示すため(図3)、全ての脂質を一度に抽出する方法は現在のところ存在しない。定法の Folch 法やBligh-Dyer法で抽出した脂質には、非極性脂質とリン脂質が主に含まれるが、高極性の脂質の回収率は悪い。高極性脂質クラスはその物性にしがった適当な方法で再抽出することが必要である。本稿では Folch 法などで抽出した脂質各クラスの分子種(構成脂肪酸の鎖長・二重結合数)組成を効率よく比較する方法について述べる。なお、中性ステロイドなど ESI でイオン化しにくい脂質クラスについては、前項で述べたイオン化法を用いた方法が開発されている<sup>2)</sup>。脂肪酸分析には多種類の構造異性体の二重結合数と位置決定が要求されるが、従来より GC/MS 最近では二次元GC×GC/MS による分析法が確立している。二重結合位置の決定には、局在化した正電荷を持つ官能基をカルボキシル末端に導入した際におこるチャージリモートフラグメンテーションを応用する。

粗抽出脂質をまずそのまま分析するが、相対的に微量成分のスフィンゴ脂質のみを対象とするときは、弱アルカリ(0.5-1 M NaOH)でグリセロ脂質中のエステルを加水分解した後に再抽出して分析する。この方が、多量に存在するトリアシルグリセロールや(TG)やホスファチジルコリン(PC)を除去できるので感度の向上を期待できる。ただし、アセチル化などスフィンゴ脂質に

存在するエステル結合も加水分解されるので注意が必要である。複雑な組成の粗抽出脂質に含まれる各種の脂質を分析する際に、まず脂質クラスの分離を行い、そのクラス内の分子種（脂肪酸組成）を分析するのが適当である。分子種分析はおもにMSの仕事であるが、クラス分離にはMS自身の分離機能を用いる方法<sup>3)</sup>とHPLCとのオンライン接続を用いる方法<sup>4,5)</sup>とがある。

MSによるクラス分離では、極性頭基から由来するクラス特異的なフラグメントを用いたプリカーサイオンスキャンやニュートラルロススキャンを駆使して分子量関連イオンを系統的に検出する（表1）。さらに特定の脂肪酸に注目した脂肪酸アニオンに対するプリカーサイオンスキャンや正イオンモードでの脂肪酸あるいは[脂肪酸-H<sub>2</sub>O]（ケテン）のニュートラルロススキャンの結果も考慮して同定の精度を上げる。このようなMSによる分離機能とLiOHの添加による特定の脂質のシグナル増強効果を併用したリピドミクス分析が行われている<sup>3)</sup>。脂質をクロロホルム/メタノール（1:2 v/v）に溶解してまず負イオンESI-MS測定して酸性リン脂質（ホスファチジルセリン（PS）、PI、PG、カルジオリピン、スルファチド）の分子種解析をする。次に、LiOHメタノール溶液を加えて弱アルカリにするとPEとセラミドの負イオンシグナルが増強される。正イオンモードではPC、SM、TG、ガラクトシルセラミド等のLi<sup>+</sup>イオン付加体が形成されMS<sup>2</sup>による分子種情報取得が容易になる。

TLC同様に（誘導体化）シリカゲルを用いる順相HPLCでは、原則として図3の非極性脂質から順に極性に従い溶出されるので主要な脂質分子を個々のクラスごとに分離することができる。逆相HPLCでは、主に脂質分子中炭化水素鎖の鎖長と不飽和度に依存する疎水性度に従って分離されるので、脂質の分子種分離に利用できる。同じm/z値の構造異性体を分離できる場合があるので、順相HPLCで分離したフラクションを逆相HPLCでさらに分離したり、MSによるクラス分離と併用したりすると分子種分析の精密化が期待できる<sup>6)</sup>。なお、順相HPLCにおいても、同じクラスに属する脂質が完全に同じ時間に溶出されるわけではなく、鎖長の長いものほど、二重結合が少ないものほど先に溶出される傾向がある。

中性脂質、リン脂質を一回のHPLCで分離するためには、ヘキサンなどの無極性溶媒（A）から水を含有する極性溶媒（C）への濃度勾配溶出が必要であ

る。AとC溶媒はお互いに混ざらないので中継ぎに両溶媒と混ざり合う溶媒Bが必要であり、3溶媒濃度勾配溶出が必要になる。MSと接続するためには、HPLCの分離能以外にイオン化効率を保つ工夫も必要である。電気伝導性のないヘキサン主体のA溶媒で先に溶出してくる中性脂質はESIができない。このため中性脂質が溶出してくる保持時間帯にギ酸アンモニウムを含むイオン化促進用極性溶媒を溶出液とティーを介して混合すると、コレステロールエステル、ワックス、TG等の非極性中性脂質もNH<sub>4</sub>付加正イオンとして効率良くイオン化される。無極性溶媒を用いるHPLCは、脂肪酸酸化誘導体やエイコサノイドのキラール分離にも用いられる。この場合には対象脂質を電子親和性のペンタフルオロベンジル化後にキラールHPLC/電子捕獲APCI/MS(MRMモード)で高感度一斉分析するキラールリポドミクスシステムが開発されている<sup>7)</sup>。

順相HPLCにオンライン接続する質量分析計には、HPLCとの接続性が良く高感度にフルスキャンMSとデータ依存的MS<sup>n</sup>スキャンができるイオントラップあるいはリニアトラップ型質量分析計を使用するのが便利である。LCQイオントラップ型装置では、交互に正負極性を切り替えながらどちらかの極性のデータ依存的MS<sup>n</sup>スキャンを行うことが可能で一回のクロマトグラフィーで多くの情報を採取することができる(交互極性切替法)。スクリーニング分析では、前半の中性脂質が溶出する時間帯には正イオンMS<sup>2</sup>スキャンを行い、後半のリン脂質溶出時間帯には負イオンMS<sup>2</sup>スキャンすれば分子種情報を得やすい。図4Aはこのようにして得たベースピーククロマトグラム( $m/z=400-1600$ )である。脂質クラス構成の全貌を鳥瞰できるので、新規の脂質の発見や脂質代謝異常の同定も容易になる。各脂質クラスに分子量関連正負イオンに特徴がありクラスの同定や混在ピークの検出に有用である(表2)。図4B-Cには脂質クラスのMSスペクトルと同定した分子種組成の例を示す。

三連四重極質量分析計のQ<sub>3</sub>(検出器側の四重極)にリニアイオントラップの機能を持たせた4000Qトラップ装置では、プリカーサイオンスキャンやニュートラルロススキャン機能も利用することができる。リン脂質分子種を逆相HPLCで分離してオンラインでこれらのMS<sup>2</sup>モードを行いクラス分離と分子

種分離同定を精密化する試みも行われている。また、MRMモードを用いて微量成分である酸化リン脂質などの高感度同定も試みられている。順相HPLCを用いる時、図4のようなクロマトグラムから得られる保持時間、分子量関連イオンの  $m/z$  値から脂質クラスを容易に帰属することができる（さらに  $MS^n$  スペクトルで確認できる）。逆相HPLC分離では保持時間をクラス同定に使えないので、 $MS^2$  モードによって脂質クラスを同定しなければならない。なお、 $MS$  スペクトルの生データから脂質を同定する解析ソフトウェア Lipid Search (<http://lipidsearch.jp/LipidNavigator.htm>) が公開されており利用することができる。

リポドミクスにおいて膨大な数の脂質分子種の個々について薬物動態分析のように同位体希釈法を用いて正確な定量をするのは不可能である。次善の策として各脂質クラスにつき内因性シグナルがほとんどない分子種（通常は短鎖の脂肪酸を含有する分子種）を一つ内部標準として加え半定量する。この際、内部標準物質 ( $s$ ) と定量すべき脂質分子種の炭素数 ( $n$ ) が異なるので  $^{13}C$  アイソトープの影響を補正しなければならない。すなわち、炭素数が増えるほど、 $M+1$  や  $M+2$  ピーク強度が大きくなるのでモノアイソトープピーク ( $I_M$ ) の相対強度が減少する。実測した  $I_M/I_M^{15}$  と定量計算に必要なアイソトープピークを足し合わせた全強度 ( $I_{total}$ ) の比 ( $I_{total}/I_{total}^{15}$ ) には以下の関係がある。  $n \neq s$  なら右辺係数で実測値を補正する。

$$\frac{I_{total}}{I_{total}^{15}} = \frac{I_M}{I_M^{15}} \frac{\left[1 + 0.011n + 0.011^2 \frac{n(n-1)}{2}\right]}{\left[1 + 0.011s + 0.011^2 \frac{s(s-1)}{2}\right]}$$

ここでISは内部標準を意味する。また、2 amu 小さいピークの  $M+2$  ピークの重なりも  $(0.011)^2 n(n-1) I_{M-2}/2$  をさし引いて補正する。HPLCを用いる方法では、ピーク強度ではなく各分子種のイオンクロマトグラムのピーク面積を用いてこれらの補正をする。脂肪酸の長さによるイオン化効率の違いの補正も必要な場合には実験で補正係数を決めて適用する必要がある。幸い、リン脂質やセラミドでは、イオン化効率はそれほど鎖長に依存しない。

リポドミクス解析のうち順相HPLCを用いる方法は、遺伝子操作マウスの脂

質異常や臨床サンプルの測定に応用され、その実用性と有効性が確かめられた<sup>4,5)</sup>。MSの分離機能を用いる方法も臨床サンプル測定や植物への寒冷ストレスの影響の検討で有効性と実用性が確かめられている<sup>3)</sup>。今後さらに測定できる脂質クラスレパートリーを増やして、真に包括的で大規模な臨床リビドミクス解析などに耐えるシステムに成長していくことが望まれる。

文献

1. E. Fahy, S. Subramaniam, HA. Brown, CK. Glass, AH Jr Merrill, RC. Murphy, CR. Raetz, DW. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, MS. VanNieuwenhze, SH. White, JL. Witztum, and EA. Dennis, *J Lipid Res.* **6**, 839-861 (2005)
2. Y. Wang, K. Karu, and WJ. Griffiths, *Biochimie*, in press (web version available) (2006)
3. X. Han and RW. Gross, *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 367-412 (2005)
4. 東城博雅 オレオサイエンス **4**, 3-12 (2004) Y. Nagatsuka, H. Tojo. Y. Hirabayashi, *Methods Enzymol.* **417**, 155-167 (2006)
6. T. Houjyou, K. Yamatani, M. Imagawa, T. Shimizu, and R. Taguchi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 654-666 (2005)
7. SH. Lee, MV. Williams, and IA. Blair, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **77**, 141-157 (2005)

表 1.

脂質クラス	前駆イオン	MS <sup>2</sup> モード	m/z	Fragments
	負イオン			
グリセロリン 脂質	(M-H) <sup>-</sup>	PR	153	Glycerol-P - H <sub>2</sub> O
PC	(M+Cl) <sup>-</sup>	NL	50	Methylchloride
PC, SM	(M+HCOO) <sup>-</sup>	NL	60	CH <sub>3</sub> +HCOO
PE	(M-H) <sup>-</sup>	PR	196	Glycerol-P-EtNH <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> O
PS	(M-H) <sup>-</sup>	NL	87	Serine - H <sub>2</sub> O
PI	(M-H) <sup>-</sup>	PR	241	Phosphoinositol - H <sub>2</sub> O
Ceramide	(M-H) <sup>-</sup>	NL	240	2-Hexadecenol
sulfatide	(M-H) <sup>-</sup>	PR	97	Sulfate
	正イオン			
PC, SM	(M+H) <sup>+</sup>	PR	184	Phosphoholine
	(M+Li) <sup>+</sup>	NL	59	Trimethylamine
	(M+Li) <sup>+</sup>	NL	183	Phosphoholine
PE	(M+H) <sup>+</sup>	NL	141	Phosphoethanolamine
PS	(M+H) <sup>+</sup>	NL	185	Phosphoserine
PI	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	NL	277	Phosphoinositol+NH <sub>4</sub>
PG	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	NL	189	Phosphoglycerol+NH <sub>4</sub>

表2 脂質クラスによる正負イオン分子量関連イオンの特徴

CE, Wax, TG, DG	$(M+NH_4)^+$	
Cer, GlcCer, PC, SM, & LPC	$(M+H)^+$	$(M+HCOO)^-$
PG, PI, PA, Car, & LBPA	$(M+NH_4)^+$	$(M-H)^-$
PE, PS, & LPE	$(M+H)^+$	$(M-H)^-$

CE, cholesterol ester; TG; triacylglycerol; DG, diacylglycerol; Cer, ceramide;

GlcCer, glucosylceramide; LBPA, lysobisphosphatidic acid;

PG, phosphatidylglycerol; Car; cardiolipin; PE, phosphatidylethanolamine;

PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine;

SM, sphingomyelin; LPC, lysophosphatidylcholine;

LPE, lysophosphatidylethanolamine.



## 図の説明

### 図1 脂質の分類

B, データベースには現在 LM の他に、LB, Lipid Bank

(<http://lipidbank.jp>)LD, LIPIDAT ( <http://www.lipidat.chemistry.ohiostate.edu>) がある。クラス、各カテゴリーに属する脂質のうち共通の化学構造を持つ一群の脂質。

### 図2. 脂質代謝の特徴

TCA、クエン酸回路 -P、リン酸

### 図3. 脂質分子の極性のスペクトルと順相HPLC溶媒の選択

点線より右側の高極性脂質の抽出時、蛋白質や非脂質の不純物が混入しやすく分析を妨げられることが多いので、それらの物性に従い最適な抽出法を選択しなければならない。

### 図4、ケラチノサイトから抽出した脂質の順相 HPLC/MS による分析例。

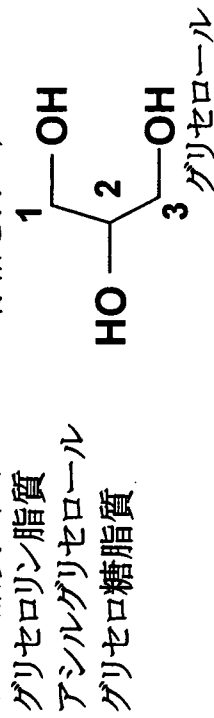
略号は表2と同じ。A, 交互極性切替法より取得した正負ベースピーククロマトグラム ( $m/z = 400-1600$ )。B, ラベルした脂質の正イオンスペクトル。C, ラベルした脂質の負イオンスペクトル。数字はそれぞれのピークの  $m/z$  値、コロンで区切った数字は脂肪酸の炭素数：二重結合数を示す。二段の数字の上段はsn-1位の脂肪酸組成でpはプラスメニル基（ビニルエーテル結合）を示す。下段はsn-2位の脂肪酸。sn-2位の脂肪酸の方が開裂しやすいのでMS<sup>2</sup> スペクトルの脂肪酸のニュートラルロスピークが大きい。

A. 代謝の理解に便利な分類

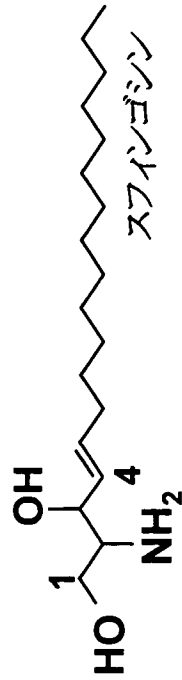
1. 単純脂質 (C,H,OからなりアセチルCoAから合成される。複合脂質の構成成分) 脂肪酸と誘導体、ステロイド(イソプレノイド)

2. 複合脂質 (N,P,Sなども含む)

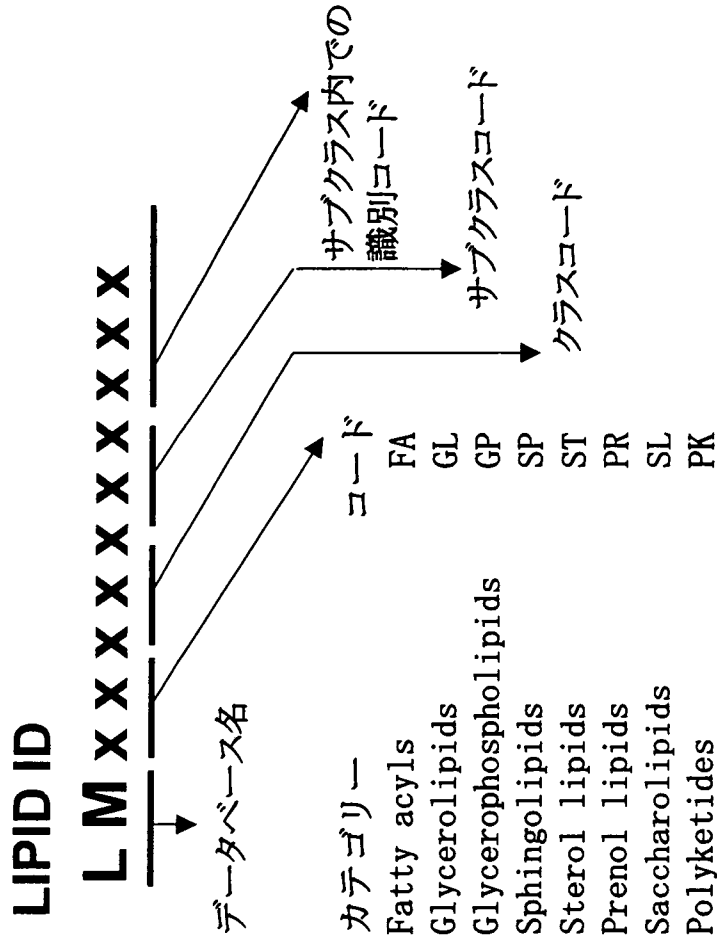
a) グリセロ脂質 (グリセロール骨格を持つ)



b) スフィンゴ脂質 (スフィンゴシン骨格を持つ)  
 スフィンゴリン脂質  
 スフィンゴ糖脂質



B. データベース用包括的分類<sup>1)</sup>



データベース名  
 LM, LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>)

糖・アミノ酸代謝

脂質代謝

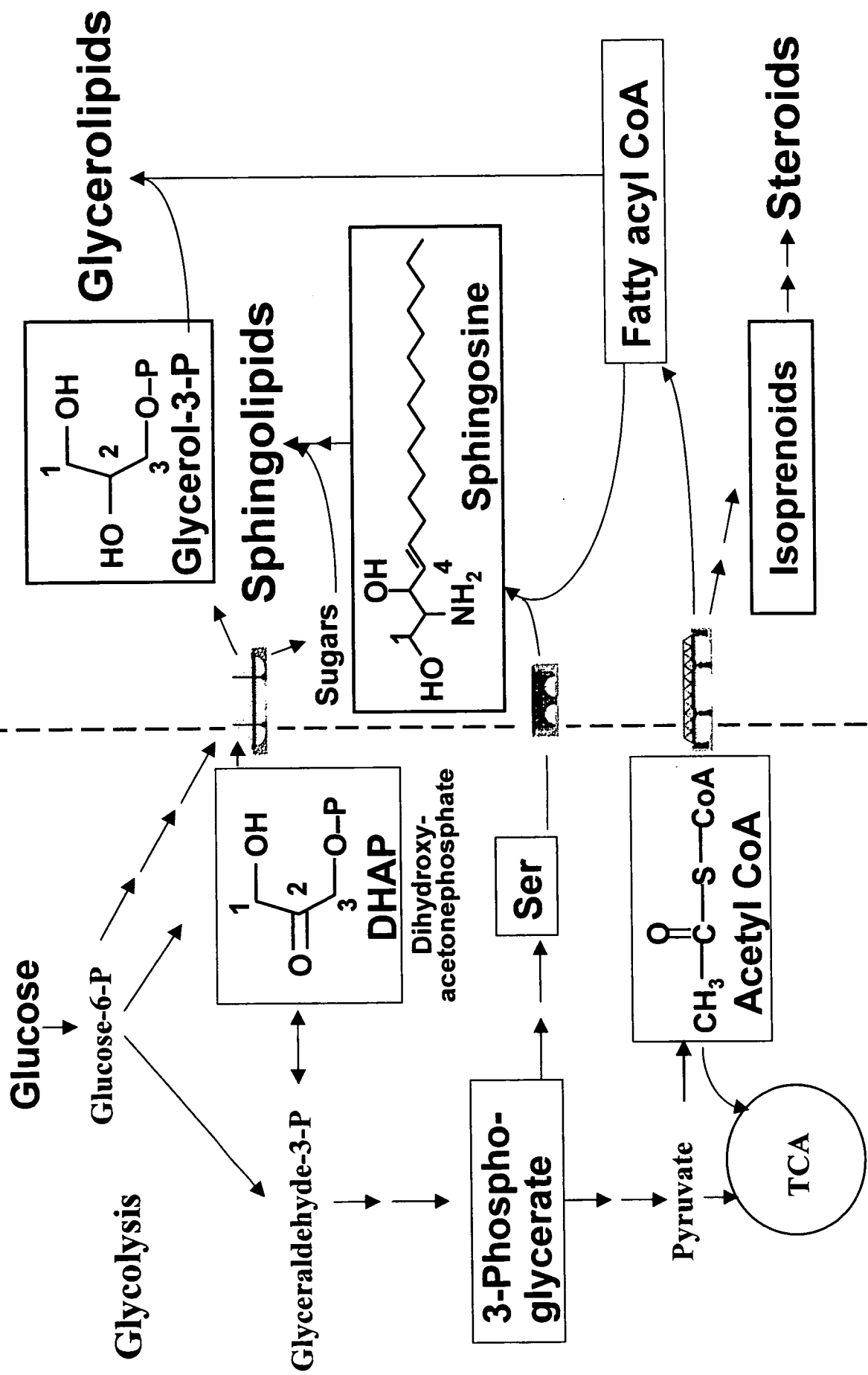


图1 图3

